

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 2 年 1 月 23 日 (2020.1.23)

【公表番号】特表 2019-509015 (P2019-509015A)

【公表日】平成 31 年 4 月 4 日 (2019.4.4)

【年通号数】公開・登録公報 2019-013

【出願番号】特願 2018-530698 (P2018-530698)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6876 Z N A Z

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 Q 1/6844 Z

C 1 2 N 15/11 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 1 年 12 月 6 日 (2019.12.6)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

二本鎖標的核酸分子を配列決定する方法であって、

( 1 ) アダプター核酸配列の対を、二本鎖標的核酸分子の少なくとも 1 つの終端に連結し、それにより第 1 の鎖アダプター - 標的核酸配列及び第 2 の鎖アダプター - 標的核酸配列を含む二本鎖アダプター - 標的核酸分子を形成するステップであって、各前記第 1 及び第 2 の鎖アダプター - 標的核酸配列が、単一分子識別子 ( S M I ) ドメインを有する、前記ステップと、

( 2 ) 前記第 2 の鎖アダプター - 標的核酸配列から前記第 1 の鎖アダプター - 標的核酸配列を物理的に分離するステップと、

( 3 ) 前記第 1 の鎖アダプター - 標的核酸配列を増幅し、それにより複数の第 1 の鎖アダプター - 標的核酸分子及び複数の第 1 鎖相補的分子を含む、増幅された生成物の第 1 の組を生成すること、及び

前記第 2 の鎖アダプター - 標的核酸配列を増幅し、それにより複数の第 2 の鎖アダプター - 標的核酸分子及び複数の第 2 鎖相補的分子を含む増幅された生成物の第 2 の組を生成するステップであって、

増幅された生成物の前記第 2 の組が、

S M I ドメインによって増幅された生成物の前記第 1 の組に関連し、及び

増幅前の前記第 2 の鎖アダプター - 標的核酸配列から前記第 1 の鎖アダプター - 標的核酸配列の物理的分離によって増幅された生成物の前記第 1 の組から区別可能である、前記ステップと、

( 4 ) 増幅された生成物の前記第 1 の組を配列決定するステップと、

( 5 ) 増幅された生成物の前記第 2 の組を配列決定するステップと、

( 6 ) 増幅された生成物の前記第 1 の組から得られた少なくとも 1 つの配列を増幅された生成物の前記第 2 の組から得られた少なくとも 1 つの配列と比較し、二本鎖標的核酸分子のコンセンサス配列を作製するステップとを含む、前記方法。

【請求項 2】

ステップ ( 2 ) が、前記二本鎖アダプター標的核酸分子を試料内に第 1 及び第 2 の鎖アダプター標的核酸配列を含む一本鎖分子に変性させ、前記二本の元々対合した第 1 及び第 2 の鎖アダプター標的核酸配列が同一の反応チャンバを共有する可能性が小さいように、複数の物理的に分離された反応チャンバ内に希釈することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記物理的に分離された反応チャンバが、容器、管、ウェル、及び非連通液滴から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ ( 3 ) が、タグ配列を有する少なくとも 1 つのプライマーの使用を通して各物理的に分離された反応チャンバのために実施され、

前記タグ配列は、タグ配列が鎖定義要素 ( S D E ) ドメインとして動作するように各反応チャンバ内で実質的異なり、及び

分離された試料が、ステップ ( 4 ) 及び ( 5 ) の前に組み換えられる、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ ( 3 ) が、前記標的核酸分子の配列の一部に特異的なプライマーの使用を通して第 1 及び第 2 の鎖アダプター - 標的核酸配列を増幅することを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

アダプター核酸配列の対が、少なくとも部分的に相補的であるプライマー結合ドメインを有し、ステップ ( 3 ) が前記プライマー結合ドメインの特異的なプライマーの使用を通して前記第 1 及び第 2 の鎖アダプター - 標的核酸配列を増幅することを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 7】

前記二本鎖アダプター標的核酸分子が、非ヌクレオチド分子又は親和性パートナーによって結合されることができる親和性標識を含み、前記非ヌクレオチド分子又は親和性標識は、前記二本鎖アダプター - 標的核酸分子の 1 つの鎖上に存在し、前記方法が、前記親和性パートナーを用いてステップ ( 2 ) において前記第 2 の鎖アダプター核酸配列から前記第 1 のアダプター核酸配列を分離し、前記非ヌクレオチド分子又は親和性標識を含む鎖を補足することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記非ヌクレオチド分子又は親和性標識が、コリシン E 2、I m 2、グルチチオン、グルタチオン - s - トランスフェラーゼ ( G S T )、ニッケル、ポリ - ヒスチジン、F L A G - タグ、m y c - タグ、またはビオチンである含む群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記非ヌクレオチド分子又は親和性標識が、ビオチンであり、前記ビオチンが、ビオチン - 1 6 - アミノアリル - 2 ' - デオキシウリジン - 5 ' - トリホスフェート、ビオチン - 1 6 - アミノアリル - 2 ' - デオキシシチジン - 5 ' - トリホスフェート、ビオチン - 1 6 - アミノアリルシチジン - 5 ' - トリホスフェート、N 4 - ビオチン - O B E A - 2 ' - デオキシシチジン - 5 ' - トリホスフェート、ビオチン - 1 6 - アミノアリルウリジン - 5 ' - トリホスフェート、ビオチン - 1 6 - 7 - デアザ - 7 - アミノアリル - 2 ' - デオキシグアノシン - 5 ' - トリホスフェート、デスチオビオチン - 6 - アミノアリル -

2' - デオキシシチジン - 5' - トリホスフェート、5' - ビオチン - G - モノホスフェート、5' - ビオチン - A - モノホスフェート、5' - ビオチン - dG - モノホスフェート、または5' - ビオチン - dA - モノホスフェートである、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記非ヌクレオチド分子又は親和性標識が、ビオチンであり、前記親和性パートナーが、基質に結合したストレプトアビジンである、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記固体基質が、固体表面、ビーズ、または別の固定された構造である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記非ヌクレオチド分子又は親和性標識が、前記第 1 のアダプター - 標的核酸配列又は前記第 2 の鎖アダプター - アダプター核酸配列の終端に位置する、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記非ヌクレオチド分子又は親和性標識が、小分子、核酸、ペプチド、及び前記親和性パートナーによって結合されることができると特有に結合可能な部分から選択される、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記親和性標識が、核酸を含み、前記核酸が、DNA、RNA、又はそれらの組み合わせを含み、場合により、ペプチド核酸又はロックド核酸を含む、請求項 13 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記第 1 のアダプター - 標的核酸配列又は前記第 2 の鎖アダプター - 標的核酸配列のいずれかが、磁気特性、電荷特性、または不溶性特性を有する物理的基を含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記物理的基が、磁気特性を有し、ステップ (2) が、前記第 1 及び第 2 の鎖アダプター - 標的核酸配列に磁場を適用し、他のアダプター - 標的核酸配列から前記磁気特性を有する前記アダプター - 標的核酸配列を分離することを含む、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記物理的基が、電荷特性を有し、ステップ (2) が、前記第 1 及び第 2 の鎖アダプター - 標的核酸配列に電場を適用し、他のアダプター - 標的核酸配列から前記電荷特性を有する前記アダプター - 標的核酸配列を分離することを含む、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 18】**

前記物理的基が、不溶性特性を有し、ステップ (2) が、前記物理的基を含む前記アダプター - 標的核酸配列を沈殿させ、前記アダプター - 標的核酸配列を分離することを含む、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 19】**

増幅された生成物の第 1 の組を配列決定することが、第 1 の鎖コンセンサス配列を作製することを含み、増幅された生成物の第 2 の組を配列決定することが、第 2 の鎖コンセンサス配列を作製することを含み、前記比較するステップが、前記第 1 の鎖コンセンサス配列を前記第 2 の鎖コンセンサス配列と比較し、前記二本鎖標的核酸分子のコンセンサス配列を作製することを含み、前記第 1 のコンセンサス配列と前記第 2 のコンセンサス配列の間の差異が、人為産物とみなされ得る、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 20】**

ステップ (6) が、相補的ではない前記二本鎖標的核酸分子の両鎖における特定の位置を同定し除去することによって前記二本鎖標的核酸分子のエラーが訂正されたコンセンサス配列を提供することを含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 21】**

SMIDメインが、少なくとも 1 つの縮重または半縮重核酸配列を含む、請求項 1 ~ 2

0 のいずれか 1 項記載の方法。

**【請求項 22】**

S M I ドメインが、アダプター核酸配列及び二本鎖標的核酸分子のランダムまたは半ランダムに切断された末端に対応する配列の対に存在する核酸配列を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項記載の方法。